

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Patent Abstracts of Japan

16

BF

PUBLICATION NUMBER : 09275994
 PUBLICATION DATE : 28-10-97
 APPLICATION DATE : 16-04-96
 APPLICATION NUMBER : 08094349

APPLICANT : SHIZUOKA PREFECTURE;

INVENTOR : OTA TOSHIYA;

INT.CL. : C12P 19/12 //(C12P 19/12 , C12R 1:20)

TITLE : PRODUCTION OF TREHALOSE

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently obtain trehalose useful as e.g. a preservative for medicines, physiologically active substances and foods by subjecting maltose to microbial cells (treated product) of microorganisms belonging to the genus Flavobacterium and capable of converting maltose to trehalose.

SOLUTION: Maltose is subjected to the microbial cells (treated product) of microorganisms belonging to the genus Flavobacterium and having ability to convert maltose to trehalose [e.g. Flavobacterium sp. F-2 (FERM P-15325)] and converted to trehalose, thus obtaining the objective trehalose in large quantities at low cost. The trehalose is useful as a preservative for e.g. medicines, diagnostics, hormones, fertilized eggs, sperms, physiologically active substances, enzymes, microorganisms, foods, as a moisturizing agent for cosmetics, or as a low-calorie sweetener.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

16
BF

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-275994

(43) 公開日 平成9年(1997)10月28日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 19/12

C 1 2 P 19/12

// (C 1 2 P 19/12

C 1 2 R 1:20)

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-94349

(22) 出願日 平成8年(1996)4月16日

(71) 出願人 591024270

フジ製糖株式会社

静岡県清水市清開 1 丁目 4 番 10 号

(71) 出願人 590002389

静岡県

静岡県静岡市追手町 9 番 6 号

(72) 発明者 窪田 悟夫

静岡県静岡市池田 1004 番地

(72) 発明者 和田 正

静岡県静岡市聖一色 25-1 ディアス川口
B 201

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トレハロースの製造法

(57) 【要約】

【解決手段】 フラボバクテリウム属に属し、マルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物の菌体又は菌体処理物を、マルトースに作用させることを特徴とするトレハロースの製造法。

【効果】 トレハロースを容易にかつ効率的に製造することができ、またバイオリクターを利用することによりトレハロースを安価に大量生産することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボバクテリウム属に属しマルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物の菌体又は菌体処理物を、マルトースに作用させてトレハロースを製造することを特徴とするトレハロースの製造法。

【請求項2】 前記微生物が、フラボバクテリウム *sp. F-2* (*Flavobacterium sp. F-2*) であることを特徴とする、請求項1記載のトレハロースの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トレハロース〔 α -D-グルコピラノシル-(1→1)- α -D-グルコピラノシド〕の製造法に関し、特に微生物の菌体又は菌体処理物を用いてマルトースからトレハロースを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】トレハロースは、グルコース2分子が α (1, 1) 結合した非還元性の二糖類で、自然界では昆虫、酵母、カビ、細菌、担子菌、紅藻、地衣類、植物マンナン、ワムシ、無脊椎動物、顕花植物等に広く分布している。このトレハロースは、水分子が重なった構造と類似しているため、生物体内では生命に不可欠な水の代役となり、細胞やタンパク質、核酸等を乾燥や凍結から守る生体保護機能及び天然保存剤としての機能を有している。従って、トレハロースは、医薬品、診断薬、ホルモン、受精卵、精子、生理活性物質、酵素、微生物等の有用物質や食品保存剤として用いることができ、また化粧品に加えることにより保水剤として用いることもできる。

【0003】また、トレハロースはストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) 等の虫歯菌による不溶性グルカンや酸を生成せず、ショ糖による不溶性グルカンの生成を抑える等の抗うしょく性を有している。そのうえ、砂糖に比べて甘味が低く、人体に吸収され難いため、トレハロースは低カロリー甘味料として有効に用いることができる。さらに、トレハロースは、血清や肝臓中のコレステロールの蓄積を抑える作用を有するとともに、腸内におけるビフィズス菌の増殖因子としての生理活性機能も有しているため、それらの作用、機能を利用した医薬品や健康食品が期待されている。

【0004】従来、トレハロースの製造法としては、パン酵母の菌体から抽出する方法、ノカルディア (*Nocardia*) 属等に属する微生物を用いた発酵による方法、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属等に属する微生物による培養法 (特開平5-211882号公報)、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属又はダイノコッカス (*Deinococcus*) 属に属する微生物による培養法 (特開平6-319

578号公報)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 由来のマルトースフォスホリラーゼ及びユーグレナグラチリス (*Euglena gracilis*) 由来のトレハロースフォスホリラーゼによりマルトースから生成する方法 (特開昭63-60998号公報)、 α -グルコース-1-リン酸及びグルコースにトレハロースフォスホリラーゼを作用させてトレハロースを生成する酵素法 (特開平6-189779号公報) などが知られている。

【0005】しかしながら、上記培養法においては、培養液中のトレハロースの蓄積量は2%以下と少なく、また上記酵素法においては、酵素の大量供給が困難である、長期安定性に欠ける、酵素活性が低いなどの点で問題があり、酵素をバイオリクターとして用いてトレハロースを連続的に大量生産するには適していなかった。マルトースフォスホリラーゼ及びトレハロースフォスホリラーゼを用いる特開昭63-60998号公報記載の発明では、それらをバイオリクターとして用いてマルトースからトレハロースを製造しているが、各酵素について異なる複数の微生物を用いており、非常に煩雑であるという問題があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、トレハロースを容易にかつ効率的に製造する方法、さらにはバイオリクターを利用することによりトレハロースを安価に大量生産できる方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題に鑑み鋭意研究の結果、本発明者等は、マルトースをトレハロースまで転換できる酵素を菌体内に有するフラボバクテリウム属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を使用することにより、トレハロースを容易にかつ効率的に製造できること、及びその微生物の菌体又は菌体処理物をバイオリクターとして用いることにより、トレハロースを安価に大量生産できることを見出し、本発明を完成した。

【0008】即ち、本発明は、フラボバクテリウム属に属し、マルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物の菌体又は菌体処理物を、マルトースに作用させてトレハロースを製造することを特徴とするトレハロースの製造法である。また、本発明は、前記微生物がフラボバクテリウム *sp. F-2* (*Flavobacterium sp. F-2*) であることを特徴とする、トレハロースの製造法である。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。本発明で用いる微生物は、フラボバクテリウム属に属し、マルトースをトレハロースに転換し得る能力を有する微生物であればいずれの菌株であってもよい。そのような菌株としては、公知の菌でもよいし、新たに土壌、海水等から分離した菌であってもよく、さらにはそれらの菌株に変異処理等を施すことによりトレハロース合成能を向上さ

せた変異株であってもよい。好ましい菌株の具体例としては、フラボバクテリウム sp. F-2 (Flavobacterium sp. F-2) が挙げられる。フラボバクテリウム sp. F-2 (Flavobacterium sp. F-2) は、本発明者らが新たに土壌より分離したトレハロース合成能を有する菌株である。

【0010】フラボバクテリウム sp. F-2 (Flavobacterium sp. F-2) のスクリーニング法の一例を以下に示す。菌株を含む土壌サンプルを滅菌水に懸濁して適宜希釈し、それを好ましくはグルコース寒天平板培地 (グルコース1.0%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び寒天1.5%) に塗抹する。この培地を30℃程度で約20時間保温し、生じたコロニーの内生育のよい菌を寒天平板培地に釣菌し、単離する。

【0011】次に、生育した菌を、例えば液体培地 (グ

(2) 生育状態

肉汁寒天平板培養

円形、全縁、半レンズ状に生育し、不透明で、表面は平滑であり、色調は黄色。

肉汁寒天斜面培地

やや隆起し、表面は平滑であり、不透明で、色調は黄色。

肉汁液体培養

良好に生育、培養液は均一に濁る。

肉汁ゼラチン穿刺培養

ゼラチンを液化しない。

【0013】(3) 生理的性質

| | |
|-----------|----|
| 硝酸塩還元 | 陰性 |
| 脱窒反応 | 陰性 |
| MRテスト | 陽性 |
| VPテスト | 陰性 |
| インドールの生成 | 陰性 |
| 硫化水素の生成 | 陰性 |
| デンプンの加水分解 | 陰性 |
| クエン酸利用 | 陽性 |
| 無機窒素源 | 陽性 |

| | |
|----------|-----------|
| 色素の生成 | 陽性 (黄色) |
| ウレアーゼ | 陰性 |
| オキシターゼ | 陽性 |
| カタラーゼ | 陽性 |
| 生育の温度範囲 | 4℃～34℃ |
| 生育のpH範囲 | pH6からpH10 |
| 酸素に対する態度 | 好気性 |
| O-Fテスト | ○ |

【0014】

(4) 糖類からの酸及びガスの生成の有無

| | 酸の生成 | ガスの生成 |
|----------|------|-------|
| L-アラビノース | 陰性 | 陰性 |
| D-キシロース | 陰性 | 陰性 |
| D-グルコース | 陰性 | 陰性 |
| D-マンノース | 陰性 | 陰性 |
| D-フラクトース | 陰性 | 陰性 |
| D-ガラクトース | 陰性 | 陰性 |
| 麦芽糖 | 陰性 | 陰性 |
| ショ糖 | 陰性 | 陰性 |
| 乳糖 | 陰性 | 陰性 |
| トレハロース | 陰性 | 陰性 |
| D-ソルビット | 陰性 | 陰性 |
| D-マンニット | 陰性 | 陰性 |
| グリセリン | 陰性 | 陰性 |
| デンプン | 陰性 | 陰性 |

【0015】(5) その他の諸性質

| | |
|---------|----|
| 蛍光色素の生成 | 陰性 |
|---------|----|

ルコース1%、ニュートリエントブロス (DIFCO社) 4%) で20時間程度振とう培養を行い、培養液を遠心分離して菌体を回収する。この菌体に約1/20容量のトルエンを添加し、15秒間程度激しく振とうする。この処理菌体にマルトースを加え、37℃程度で約20時間反応させた後遠心分離する。次いで、高速液体クロマトグラフィーによって標準のトレハロースとリテンションタイムが一致するピークが確認できる菌株を選抜すればよい。このようにして得られる菌株F-2の菌学的性質は下記に示すとおりである。

【0012】(1) 形態

| | |
|---------|------------|
| 細胞の形 | 桿菌 |
| 細胞の大きさ | 0.7×1.4 μm |
| 運動性 | なし |
| 鞭毛の着生状態 | 複数の極鞭毛 |
| グラム染色 | 陰性 |

| | |
|------------|----------|
| エスクリンの分解 | 陽性 |
| アルギニンの分解 | 陰性 |
| PHBの蓄積 | 陰性 |
| ONPGテスト | 陰性 |
| Tween80分解性 | 陰性 |
| レシチナーゼ活性 | 陰性 |
| GC含量 | 59.8mol% |
| イソプレノイドキノ | Q-9 |

【0016】以上の菌学的性質を有する菌株F-2を、バーギーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) 第1巻 1984年に従って検討した結果、この菌株はフラボバクテリウム (Flavobacterium) 属に属する菌株であると同定され、フラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. F-2とした。このフラボバクテリウム (Flavobacterium) sp. F-2は、平成7年12月4日付で、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-15325として寄託されている。

【0017】上記微生物の培養に用いる培地としては、通常使用されるものであればよく、炭素源としては、グルコース、フラクトース、マルトース、澱粉、粗糖、蔗糖蜜等を単独で又は混合して用いることができる。窒素源としては、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイープリカー、尿素等の有機窒素源のほか、硫酸、硝酸、燐酸等のアンモニウム塩などの無機窒素源を単独で又は混合して用いることができる。無機塩類としては、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン、鉄等の硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、硝酸塩、燐酸塩等をそれぞれ単独で又は組み合わせて用いることができる。

【0018】培養は、振とう培養又はジャーファーメンターを用いて通気条件下で行うことができる。培地のpHは6~8の範囲内が好ましく、培養温度は25~33℃の範囲内が好ましく、培養時間は1~3日間が好ましい。培養終了後の培養液からの菌体の回収は、遠心分離又は限外濾過等の濾過分離によって行えばよい。

【0019】培養によって得られた上記菌体は、生菌のまま用いるか、凍結乾燥するか又はトルエン、アセトン等で処理して用いるかさらには公知の固定化法、例えば包括法、担体結合法、架橋法等で固定化し、固定化菌体として用いてもよい。包括法としては、カラギーナンやアルギン酸等の天然高分子又はモノマーやプレポリマーによる合成高分子を用いる方法が挙げられる。担体結合法としてはキトサン等に吸着させる方法がある。架橋法としては、グルタルアルデヒド等を用いることができる。

【0020】また、菌体を公知の菌体破砕法、例えば超音波破砕法、フレンチプレス破砕法、ガラスビーズ破砕

法、ダイノミル破砕法等により破砕して酵素を抽出し、その抽出液を粗酵素液として、菌体と同様に固定化して固定化酵素として用いることができる。粗酵素液は、硫酸沈殿による塩析法、限外濾過膜による濃縮法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー又はゲル濾過クロマトグラフィーによる分離等の組み合わせにより精製して精製酵素として用いることもできる。

【0021】本発明において、菌体処理物とは、上記のような菌体の破砕物、磨砕物、固定化菌体、又はそれらから単離した粗製もしくは精製酵素、それら酵素を固定化した固定化酵素等をいうものとする。本発明では、上記菌体又は菌体処理物をマルトースに作用させることによってトレハロースを製造する。本発明において重要なことは、培養液中あるいは菌体内よりトレハロースを抽出精製する方法とは異なり、基質であるマルトースに菌体又は菌体処理物を直接に作用させてトレハロースまで転換させることである。反応液中の成分は糖がほとんどであり、他の有機物等を含まないため、従来技術と比較して反応液からのトレハロースの分離精製が非常に容易である。

【0022】または、その酵素活性は高いため、効率的にトレハロースを製造することができ従来の酵素法のようにマルトースフォスホオリラーゼについてある種類の微生物、トレハロースフォスホオリラーゼについて別の種類の微生物を用いなくてはならないという煩雑さがないため、簡単にトレハロースを製造することができる。

【0023】この反応における基質としてのマルトースの濃度は、10mM~2Mが好ましい。また、反応温度は30~60℃、pHは5~9が好ましく、1~200時間反応させるのが好ましい。pHを一定に維持するためには、リン酸緩衝液を使用するのが好ましい。固定化菌体又は固定化酵素として使用する場合、連続法によって行うこともでき、例えばそれらをカラムに詰めて、バイオリクターとして、回分式と同様の反応条件で一カ月から一年間連続通液を行うことにより、トレハロースを安価に連続的に大量生産することができる。

【0024】反応終了後、遠心分離又は限外濾過等の濾過分離により晶析するか、あるいは反応液から菌体又は菌体処理物を除去する。得られた上清又は濾液より、活性炭やイオン交換樹脂クロマトグラフィーを用いてトレハロース画分を集める。イオン交換樹脂クロマトグラフィーは、Na型又はCa型の陽イオン交換樹脂を用いて擬似移動床法によって行うのが好ましい。次いで、得られた画分を濃縮して、煎糖晶析法、冷却晶析法、エタノールによる晶析法等によりトレハロースを晶出させる。また、必要により再結晶を行って精製することができる。本発明では、菌体又は粗製もしくは精製酵素を担体に固定化することにより、その固定化菌体又は固定化酵素を繰り返し使用でき、その結果、連続的に大量にトレ

ハロースをマルトースから製造することができる。

【0025】

【発明の実施の形態】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0026】〔実施例1〕 菌株の分離

静岡県 of 土壌より採取した土壌サンプル約1gを10mlの滅菌水に懸濁して適宜希釈し、その0.1mlをグルコース寒天平板培地（グルコース1.0%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%及び寒天1.5%）に塗抹した。この平板培地を30℃の孵卵器で24時間保温し、生じたコロニーの内生育のよい菌を寒天平板培地に釣菌し、単離した。次に、生育した菌の1白金耳を、10mlの液体培地（グルコース1%、ニュウトリエントブロス（DIFCO社）4%）を入れた50ml容大型試験管に接種し、30℃で20時間振とう培養を行い、培養液を遠心分離して菌体を回収した。この菌体に1/20容量のトルエンを添加し、15秒間激しく振とうした。

【0027】この処理菌体に50mMのマルトース1mlを加え、37℃で20時間反応させた後遠心分離して、その上澄みを高速液体クロマトグラフィー（カラム；YMC-03（山村化学社製）、溶離液；アセトニトリル：水=80：20、流速1ml/min、温度；40℃、検出器；示差屈折計）にて分析した。分析の結果、標準（和光純薬社製トレハロース）とリテンションタイムが一致するピークが確認された菌株を選抜した。本発明者らは、この菌株をフラボバクテリウム sp. F-2と称することとした。

【0028】凍結乾燥菌体によるトレハロースの製造
フラボバクテリウム sp. F-2を、液体培地（グルコース1%、ニュウトリエントブロス（DIFCO社）4%）3リットルを含む5リットル容ジャファーメンターで30℃、20時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、さらに菌体を蒸留水に懸濁し、遠心分離により菌体を回収する作業を2回繰り返して、菌体を洗浄した。集めた菌体を凍結乾燥し、粉末菌体とした。

【0029】基質となる反応液としては、100mMのマルトース（0.1MKH₂PO₄-K₂HPO₄ pH7.0）を用いた。この反応液に粉末菌体を加え、37℃で24時間反応させた後、遠心分離し、得られた上澄み液から高速液体クロマトグラフィー（分取用カラム；アサヒバックNH2P50（旭化成社製）、溶離液；アセトニトリル：水：リン酸=80：17：3、カラム温度40℃、流速：1ml/min）を用いてトレハロース画分を分取した。

【0030】このトレハロース画分について核磁気共鳴装置及び質量分析計により分析した結果、標準（和光純薬社製トレハロース）のスペクトルと一致した。さらに微生物（菌体外トレハラーゼ生産菌Chaetomiu

m aureum）より分離精製したトレハラーゼと反応させたと、グルコースの生成が確認できた。この結果より、本微生物によりマルトースから生成した物質は、トレハロース（O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranoside）であることが判明した。また、実施例1における反応液中のトレハロース量を測定したところ、60mMトレハロースまで反応が進んでいた。これより、マルトースからトレハロースへの転換率は60%であると計算された。

【0031】〔実施例2〕 固定化菌体によるトレハロースの製造

実施例1で調製したフラボバクテリウム sp. F-2の凍結菌体2gを、0.9%NaCl溶液で溶解して8mlとし、45℃で加温した。これに、予め45℃に加温したカラギーナン溶液（カラギーナン2gを45mlの0.3M KClで溶解したもの）を加えてよく混合し、その後水浴中で冷却した。冷却後、500mlの0.3M KClを加え4℃にて一夜放置した。ゲル化した固定化菌体を3mm角に切断し、500mlの0.3M KCl及び1000mlの0.1Mリン酸バッファーpH7.0で洗浄し、39gの固定化菌体を得た。

【0032】得られた固定化菌体8gに、6.25mlの1Mマルトース溶液（0.1Mリン酸バッファーpH7.0含有）を加えて45℃で振とう反応をおこなった。反応終了後、上澄み液を高速液体クロマトグラフィーで定量した結果、7日間で転換率約50%、200mMのトレハロースが生成されたことが分かった。

【0033】〔実施例3〕 トレハロース合成粗酵素によるトレハロースの製造

培養したフラボバクテリウム sp. F-2の菌体を蒸留水で十分に洗浄後、菌体5gに、30mlの0.05Mリン酸バッファーpH7.0を加え、水中にて超音波破碎機で細胞を破碎した。破碎処理液から遠心分離によって沈殿を除去し、上澄み液の粗酵素28mlを得た。この粗酵素液に13.5gの硫酸アンモニウムを徐々に加え、4℃にて一夜放置した。硫酸アンモニウムで沈殿した粗酵素液を遠心分離にて回収し、その後0.1Mリン酸バッファーで再溶解し、同バッファーで透析を行い、粗酵素12.0ml（2.5単位）を得た。

【0034】キトバールBCW2603（富士紡績製）50mlを4リットルの蒸留水で洗浄後、135mlの0.1Mリン酸バッファーpH7.0、2.25mlの蒸留水及び20mlの14%グルタルアルデヒド溶液を加えて混合し、2時間振とう反応を行った。反応終了後6リットルの蒸留水で洗浄し、活性化キトバールを得た。活性化したキトバール10mlに粗酵素10mlを加え、4℃にて一夜振とうさせ、固定化させた。固定化終了後、0.1Mリン酸バッファーpH7.0でよく洗浄し、固定化酵素を得た。

【0035】得られた固定化酵素10mlに7.5gのマルトース及び0.5Mリン酸バッファーpH7.0を加え、蒸留水で20mlとし、37℃で振とう反応を行った。反応終了後、上澄み液を高速液体クロマトグラフィーで定量した結果、4日間で転換率40%、3gのトレハロースが生成されることが分かった。

【0036】

【発明の効果】本発明によれば、トレハロースを容易にかつ効率的に製造することができ、またバイオリクターを利用することによりトレハロースを安価に大量生産することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 大口 真央
静岡県静岡市登呂4丁目25番8号
(72)発明者 佐野 孝文
静岡県庵原郡富士川町南松野1759-4

(72)発明者 大石 一男
静岡県沼津市三園町7-1 職住303
(72)発明者 山岸 政昭
静岡県焼津市小川256-2
(72)発明者 太田 俊也
静岡県駿東郡清水町柿田178-3 職住301